人源 CT55 蛋白原核表达及单克隆抗体的制备

任建委[1]，李军[2]，李尚泽[1*]

（1.西藏大学 医学院，西藏自治区 拉萨 850000；2.武汉大学 生命科学学院 湖北省 武汉 430072；1*.武汉大学 中南医院，湖北省武汉 430071；）

摘要：为制备 Cancer testis 55（CT55）单克隆抗体，需构建带有人源 CT55 片段的原核表达质粒，把该质粒转化 Rosetta 感受态进行原核表达并得到目的蛋白，蛋白被纯化后免疫 6w 雌性 BALB/c 小鼠。按传统的单克隆抗体的制备方法，取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞（sp2/0）进行融合，经 ELISA 方法筛选及两次连续亚克隆，共获得多株能稳定分泌抗 CT55 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞，如 3D8B7B12、4C8E1C9、3D8C10G9 等。ELISA 及 Western Blot（WB）分析结果表明，筛选的细胞株均能产生单克隆抗体，且该抗体均分别能与原核表达及真核表达的 CT55 蛋白发生特异性结合。单克隆抗体可用于免疫荧光试验，且与 P53 发生互作的荧光主要位于细胞核边缘。结果表明，本研究成功制备了针对人源 CT55 蛋白的单克隆抗体。CT55 蛋白单克隆抗体的制备为今后肝癌、胃癌、结肠癌等癌症的快速的病原学诊断以及 CT55 蛋白的结构和功能研究奠定了物质基础。

关键词： CT55；原核表达；单克隆抗体

Human CT55 protein prokaryotic expression and its production of monoclonal antibody

Abstract In order to prepare the monoclonal antibody of Cancer testis 55 (CT55), the prokaryotic expression plasmid with human CT55 fragment was constructed first, and the plasmid was expressed in the Rosetta competent cell. The target protein was purified and immunized for 6 weeks young female BALB/c mice. According to the preparation method of the conventional monoclonal antibody, the spleen and myeloma cells (SP2/0) of mice was prepared to fuse together. The hybridoma cell lines were obtained by indirect ELISA method and 2 successive subclones, such as 3D8B7B12, 4C8E1C9 and 3D8C10G9. The results of ELISA and Western Blot (WB) analysis showed that the screened cell lines could produce monoclonal antibodies, and the antibody could specifically recognize the prokaryotic expression and eukaryotic expression of CT55 protein. Specific antibodies can be used in immunofluorescence test, and fluorescence is mainly located at the edge of nucleus. The results showed that monoclonal antibodies against human CT55 protein were successfully prepared in this study. The preparation of CT55 protein monoclonal antibody has laid the material foundation for the rapid etiological diagnosis of cancer of liver cancer, gastric cancer and colon cancer, and the structure and function of CT55 protein.

Keywords CT55; prokaryotic expression; monoclonal antibody

肿瘤睾丸抗原(cancer-testis antigens, CTAs)是一大类肿瘤相关类抗原，CT 基因在少量正常组织中微量表达（但在睾丸高表），在多种肿瘤组织里大量表达，包括 XAGE 家族[1]、GAGE 家族[2]、MAGE 家族[3]等。CT55 是一种新颖的肿瘤睾丸抗原，又叫 CXorf48、BJ-HCC-20A[4]，位于 X 染色体的长臂上。在哺乳动物细胞中证实了 BJ-HCC-20A 蛋白可以与 BRCA2 互作[5]，而且，CT55 也可以作为一个治疗 CML 患者的潜在靶位点[6]。

基金项目：武汉大学青年教师资助项目（2042018kf0076）
作者简介：第一作者：任建委（1991-），女，山东菏泽人；助教；研究方向：肿瘤分子生物学；邮箱：2467057909@qq.com.
通讯作者：李尚泽（1986-），男，重庆人;武汉大学中南医院助理研究员；研究方向：肿瘤分子生物学；邮箱：342883635@qq.com.

单克隆抗体技术是二十世纪七八十年代兴起并由 Kohler 和 Milstein 创立的分子生物学技术[7]，两人于 1984 年获得诺贝尔奖。当时为获得大量单克隆抗体，两人通过 PEG 或灭活仙台病毒将小鼠骨髓瘤细胞（sp2/0）与小鼠脾脏细胞（被绵羊红细胞免疫过）融合，融合后的二倍体细胞叫杂交瘤细胞。杂交瘤细胞既能够分泌相应抗原的抗体，又能在体外培养的条件下进行无限增值[8]。自该技术出现以来，单克隆抗体便被广泛应用。但抗体绝大多数是鼠源的，当鼠源抗体注入人体后会引起机体免疫系统发生反应，产生人抗鼠抗体[9]。为了突破这一限制，研究者已经应用基因工程技术和基因治疗技术探究出多种对鼠源的单克隆抗体进行部分或者全部人源化改造方法[10-13]，经过人源化改造后的单克隆抗体具有良好的发展和应用前景[14]-[15]。单克隆抗体现被广泛用于制备“生物导弹”，作为免疫抑制剂，用于临床诊断等方面[16]。

1.材料

人结肠癌细胞（HCT116）、胚胎肾细胞（293T）、骨肉瘤细胞（sp2/0）、Rosseta 表达菌、CT55 真核表达质粒、T1 感受态、真核表达载体为 pcDNA5-FLAG、BALB/c 小鼠等。

2.方法

2.1　pET28b-CT55 质粒的构建　从 Genebank 中获取 CT55 较长剪接体的基因序列，设计并合成引物。在 CT55 基因的上游、下游分别添加 BamH I、Xhol I 酶切位点，并在酶切位点的两端添加 2-3 个保护碱基。具体引物设计如下：

CT55 上游：5’-cgggatccgatgctcaggcttctgagact-3’

CT55 下游：5’-ccgctcgagaatgctttggctccgacgtt-3’

带有 CT55 片段的质粒从实验室冻存库中获得。经过普通 PCR 和凝胶电泳，切取目的带凝胶并回收，回收后进行酶切。将酶切片段连接到被同种双酶切的原核表达载体 pET 28b 上，转化 T1 感受态并涂平板。待长成菌落后，做菌落 PCR 进行初步鉴定。鉴定成功的菌落可接菌提质粒进行酶切和测序鉴定。

2.2 CT55 原核蛋白表达及纯化　将重组质粒 Pet28b-CT55 转化到 Rosetta 感受态，进行诱导表达并纯化。步骤如下：①菌株活化。②扩大培养。将活化菌以 1:100 的比例接种到含有 Kana 的 200ml LB 培养基，37 ℃摇床孵育至菌液 OD 值为 0.6-1。加入适宜浓度的 IPTG 溶液，诱导 3-4 h。③将 200 ml 菌液离心。3800 rpm 离心 12 min。弃培养基，保留菌体沉淀。④用 6 ml 冰置的 PBST 溶液悬浮沉淀。超声破碎。4℃、8000 rpm 离心 12 min，保留上清。再用 1 ml TNMFX-2M Urea 缓冲液吹散沉淀。200 W，3s/3s 超声破碎 2 min。额外加入等量的 PBST 溶液，摇晃均匀并置于摇床，4 ℃，30 min。4 ℃、4000 rpm 离心 20 min。⑤重复④。⑥用 1 ml TNMFX-0.1%Triton-x100 重悬沉淀。超声破碎，200 W，1 min，3 s/3 s。额外加入等量的 TNMFX-0.1%Triton-x100 溶液，摇晃均匀并置于摇床，4 ℃，30 min。4 ℃、4000 rpm，20 min。⑦重复⑥。⑧用清水洗沉淀 2-3 次。1000 rpm 离心 2min，直至上清透亮，弃去上清。⑨用 8 M Urea 溶解沉淀。取 30 μl 蛋白溶液和 10 μl 4×蛋白 loading 混合，95℃，变性 15 min。

2.3 通过考马斯亮兰染色及 Western Blot（WB）检测表达产物　分别获取 IPTG（-）菌液作为 control、IPTG（+）诱导后上清、IPTG（+）诱导后沉淀样品，加入 SDS，95℃变性 10min，分别进行考染和 WB 检测。在做考染时，取 0.5μg 的 BSA 样品作为浓度参考。SDS-PAGE 电泳结束后，将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜，再将 PVDF 膜放入盛有 3%脱脂牛奶的盒内，室温封闭 1h。加入鼠源一抗抗 His 抗体，4℃孵育过夜。TBST 溶液洗膜 3 次，5 min/次，加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠源二抗 IgG 抗体室温孵育 1h。TBST 溶液洗膜，用超

敏 ECL 发光液，在 Image 软件中选择合适参数在 Western 成像仪中曝光并保存。

2.4 单克隆抗体制备方法

①免疫小鼠。小鼠的免疫是按照北京博奥龙免疫技术有限公司提供的 QuickAntibody-Mouse5W 说明书进行的，免疫过程中用到的佐剂也是购自该公司。

②取尾血检测。准备 6 个 1.5 ml EP 管。向 1.5 ml EP 管中加入 45 μl 生理盐水，取尾血 5 μl 加至上述 EP 管，迅速混匀。被采尾血的免疫小鼠分别编号为头、中、尾、头中、头尾。未经免疫的小鼠做阴性对照。

③ELISA 检测抗体效价。用纯化的 CT55 蛋白包被 ELISA 酶标板后封闭，阴、阳性小鼠血清作一抗，HRP 标记的羊抗鼠作二抗，建立间接 ELISA 方法，筛选阳性杂交瘤细胞。

④制备饲养层细胞。用未免疫的小鼠脾脏细胞制备饲养层，一个小鼠的脾脏细胞可以铺 5 个 96 孔板。饲养层细胞能够释放某些生长因子，减少孔板中的物质对杂交瘤细胞的伤害。

⑤细胞融合。准备各种解剖用具及所需材料。A.摘除小鼠眼球取血，血清作为多克隆抗体供 ELISA 检测的阳性对照。B. 酒精中浸泡 5 min，剪开小鼠皮肤撕开皮毛以露出腹膜，取出小鼠脾脏并用注射器内芯研磨。C. 转移至 50 ml 离心管。与此同时，将 sp2/0 细胞从皿壁上吹下并转移到 50 ml 离心管。室温下，800 rpm 离心 5 min。D. 用基本 DMEM 培养基洗细胞 2 次。E. 把两种细胞混合，1000 rpm 离心 5 min。弃去全部上清，将细胞磕散，使其松动。F.缓慢加入 1 ml PEG。最好在 1 min 内匀速滴加，再用 30 s 将细胞吹打均匀，另 30 s 静置。G.离心，弃培养基，保留细胞沉淀。H.将细胞沉淀轻轻拍散，加入含 10%血清 HAT 培养基。将细胞悬液用排枪加到 5 个铺有饲养层的 96 孔板里，放回细胞培养箱中培养。

⑥亚克隆筛选。在显微镜下找到 ELISA 检测阳性及生长良好的杂交瘤细胞孔并标号，对阳性细胞株进行亚克隆。以单个阳细胞孔为例，简要叙述亚克隆的步骤。A.准备酶标板，向孔里加入 20 μl 台盼蓝染液。B.将目的孔的细胞（如 4C8，表示第四个板子上标号为 C8 的孔）轻轻吹起使细胞悬浮，取等量细胞培养液与台盼蓝等比例混合，在显微镜下，对四个方格中的细胞进行计数。C.根据 n=50/N(N 代表四格中细胞的总数目，n 代表上样量)分单克隆。96 孔板中每四排分一个杂交瘤细胞株并标号。D.待细胞密度长至约 80%，再进行 ELISA 检测并亚克隆。

⑦杂交瘤细胞株的 WB 检测及扩大培养。杂交瘤细胞经过两次亚克隆后传至 24 孔板。经过 3-4 天的培养，待 24 孔板杂交瘤细胞的密度长到约 80%，收集培养基，做 WB 实验，检测杂交瘤细胞的阳性。

⑧Balb/c 小鼠体内抗体生产。在接种杂交瘤细胞前 3-5 天，需向小鼠腹腔注射弗氏不完全佐剂。将 24 孔板的细胞吹下并转到 1.5 ml EP 管中，800 rpm 离心。弃上清，用 500 μl PBS 重悬细胞后腹腔注射。两周后，将小鼠引颈处死，用 1 ml 移液器抽取腹水。4℃，6000 rpm 离心 10 min。腹水以 1:500 的比例稀释用于 WB 检测。剩余腹水可用于纯化并置于-20℃保存。

3.结果

3.1 重组质粒的构建。设计并合成 CT55 片段引物，经过 PCR 得到的片段大小与预期大小一致。目的片段与 pET28b 原核表达质粒分别用 BamH I、Xhol I 双酶切后，连接，得到重组质粒。

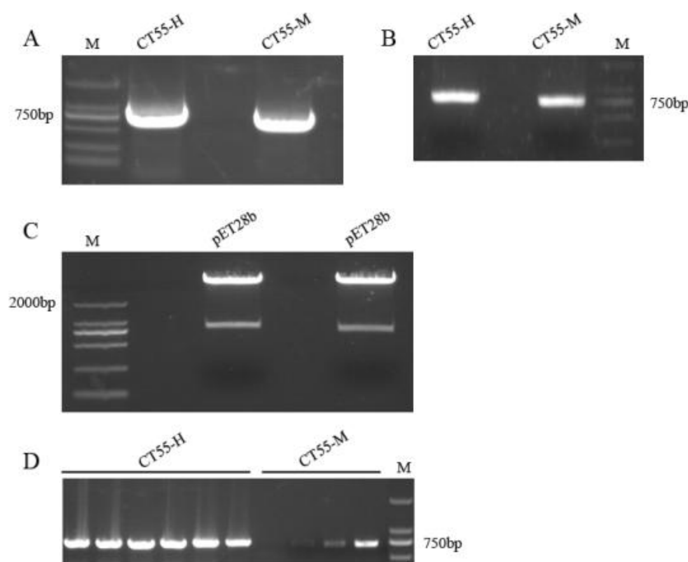


图 1 CT55 基因克隆全过程

Fig.1 The whole process of CT55 gene cloning

图 A：目的片段的 PCR 结果。图 B：目的片段的酶切。图 C：表达载体的酶切。图 D：菌落 PCR 检测

M：DNA Marker; CT55-H:人源 CT55 片段；CT55-M:鼠源 CT55 片段（附带结果）

3.2 原核蛋白诱导表达。 本研究对 IPTG 浓度进行了摸索，如图 2A，选用的 IPTG 浓度为 0.5mM 和温度是 37 ℃。表达载体是带 his 标签，为了排除目的带的假阳性，利用剩余蛋白样品做 WB 实验，孵育鼠源 his 抗体，也可以检测到条带。随后进行大量蛋白诱导和纯化。CT55 蛋白的纯化使用逐步离心和洗涤的方法（见 2.2）。目的蛋白分子理论值约为 34 KDa，对 CT55 蛋白进行考马斯亮蓝染色、WB 鉴定。实验结果如下：

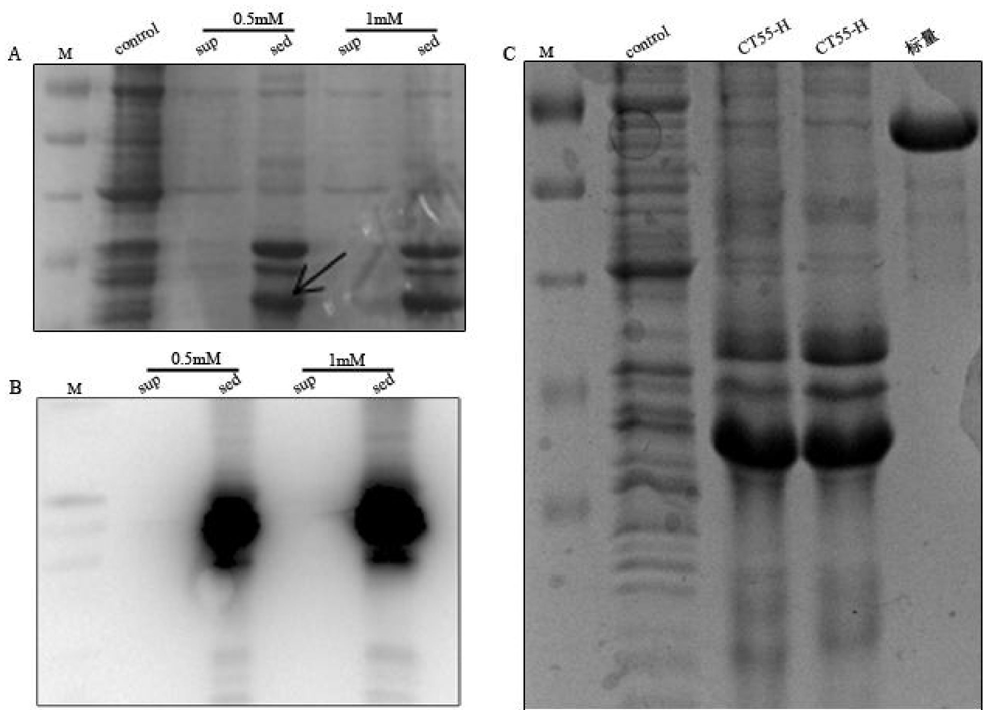


图 2 CT55-H 蛋白的诱导条件摸索和蛋白纯化

Fig.2 Exploration of CT55-H protein induction conditions and protein purification

图 A 为 CT55 蛋白诱导的考马斯亮蓝图。进行 CT55 蛋白诱导时对 IPTG 浓度的摸索， control 代表对照，sup 代表上清，sed 代表沉淀。图 B 为 CT55 蛋白 WB 图。图 C 为 CT55 蛋白纯化的考马斯亮蓝图。

Fig. A show coomassie blue staining analysis of CT55 protein induction. IPTG concentration were optimized by a series of experiments, control represent no IPTG induction, sup represent supernatant, sed represent sediment. Fig. B show western blot analysis of CT55 protein. Fig. C show coomassie blue staining analysis of CT55 protein purification.

3.3 免疫效果检测

取小鼠尾血进行 ELISA 检测，对抗体效价进行粗略的评估。采集被免疫小鼠的尾血 5 μL 并加到 45 μL 生理盐水中，37℃恒温 1h 后 置于 4℃以 5500 rpm 离心 10min 取上清待用。再用脱脂牛奶将取得的上清稀释 50 倍，此时血清被稀释 500 倍。从 ELISA 酶标板第 1 个孔开始，每孔中加入脱脂牛奶，加入等量被稀释的血清。从左到右逐步两倍稀释，则第 1 个孔的血清被稀释 1000 倍，第 2 个孔被稀释 2000 倍，以此类推将小鼠血清稀释到 128000 倍。使用未免疫的小鼠血清用以做阴性对照，同样方式进行处理，测定小鼠血清效价。最后，利用 ELISA 法检测各孔在 450nm 下的吸光值，如图 3 所示，可见抗体效价已达 6.4 万倍。

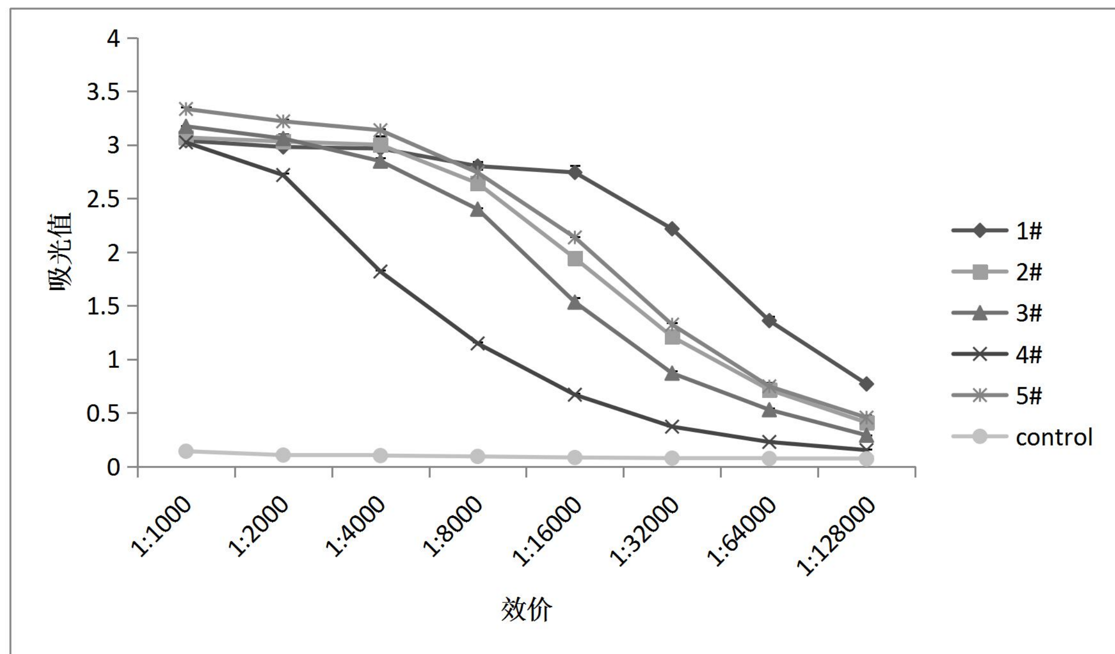


图 3 免疫小鼠血清效价测定

Fig.3 Serum titer determination of immunized mice

3.4 细胞融合及杂交瘤细胞筛选

细胞融合后的第 3 天，普通显微镜下可见几个透明的细胞黏连。第 5 天，用 HAT 培养基给杂交瘤细胞半换液。第 10 天开始更换 HT 培养基。融合细胞生长如下图 4。

待孔中的杂交瘤细胞长至 80%密度，进行 ELISA 鉴定。ELISA 检测结果见表 2，标记方法：第 1 块 96 孔板，选择的效价较高的孔有 C6、E9，分别记为 1C6、1E9；第 2 块 96 孔板，选择的效价较高的孔为 C10、D4，分别记为 2C10、2D4；…；第 5 块 96 孔板，选择较高效价的 E1、E5，分别记为 5E1、5E5。对每块 96 孔板随机挑了 2-3 个细胞状态良好的 ELISA 阳性孔进行第一次亚克隆。

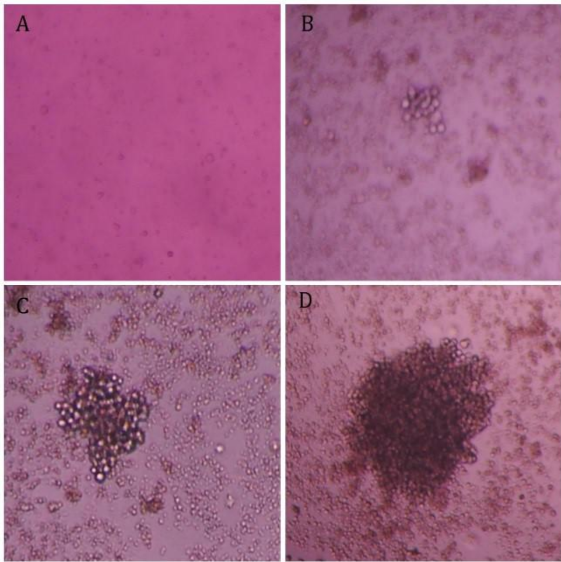


图 4 细胞融合

Fig.4 Cell fusion

A 第 1 天　B 第 3 天　C 第 5 天　D 第 10 天

A:Day one　B:Day three　C: Day five　D: Day ten

表 1 采用 ELISA 方法筛选阳性克隆细胞株

Table 1 ELISA were used for screening the positive cell clones

1 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.446	1.493	1.482	1.678	1.555	1.626	1.543	1.428	1.415	0.668	1.421	1.192	450
B	1.732	1.266	1.516	1.689	1.454	1.39	1.315	1.521	1.374	1.103	1.391	1.358	450
C	1.724	1.517	1.893	1.785	1.954	1.641	1.593	1.832	1.867	1.46	1.614	1.476	450
D	1.713	1.446	1.796	1.818	1.633	1.566	1.569	1.595	1.615	1.53	1.442	1.467	450
E	1.498	1.705	1.451	1.802	1.658	1.484	1.423	1.463	1.415	1.292	1.503	1.267	450
F	1.879	1.515	1.429	1.636	1.541	1.716	1.498	1.455	1.43	1.607	1.555	1.378	450
G	1.589	1.604	1.412	1.545	1.707	1.572	1.397	1.521	1.368	1.311	1.191	0.059	450
H	0.851	1.04	1.093	0.925	1.189	0.963	0.602	0.841	0.886	0.738	0.862	0.599	450

2 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.427	1.335	1.329	1.303	1.193	1.199	1.292	1.301	1.176	1.243	1.277	1.348	450
B	1.471	1.485	1.287	1.595	1.39	1.374	1.402	1.318	1.399	1.267	0.834	1.041	450
C	1.668	1.396	1.428	1.416	1.734	1.446	1.443	1.423	1.431	1.502	1.36	1.289	450
D	1.397	1.463	1.411	1.723	1.463	1.382	1.442	1.339	1.251	1.8	1.262	1.046	450
E	1.551	1.386	1.436	1.502	1.424	1.65	1.433	1.523	1.408	1.571	1.121	0.858	450
F	1.607	1.635	1.619	1.491	1.593	1.523	1.438	1.843	1.39	1.394	1.236	1.531	450
G	1.45	1.549	1.587	1.465	1.476	1.616	1.436	1.631	1.653	1.374	1.249	1.331	450
H	1.575	1.778	1.524	1.571	1.517	1.618	1.315	1.621	1.644	1.56	1.392	1.533	450

3号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.068	1.639	1.503	1.411	1.477	1.295	1.391	1.512	1.541	1.167	1.314	0.771	450
B	1.044	1.277	1.249	1.274	1.26	1.332	1.319	1.248	1.398	1.343	1.849	1.362	450
C	1.392	1.507	1.444	1.486	1.583	1.456	1.482	1.578	1.291	0.579	1.377	1.43	450
D	1.372	1.473	1.306	1.506	1.912	1.517	1.513	1.987	1.763	1.599	2.026	1.568	450
E	1.188	1.12	1.364	1.523	1.428	1.691	1.443	1.786	1.464	1.574	1.611	1.351	450
F	1.296	1.342	1.249	1.345	1.543	1.013	1.164	1.55	1.206	0.907	0.895	1.15	450
G	1.422	1.364	1.365	1.403	1.646	1.233	1.387	1.532	1.439	1.168	1.447	1.297	450
H	1.371	1.378	1.267	1.328	1.493	1.253	1.252	1.306	1.422	1.249	1.33	1.35	450

4号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.282	1.336	1.337	1.503	1.538	1.512	1.565	1.681	1.057	1.381	1.475	1.209	450
B	1.308	1.893	1.544	1.606	1.695	1.709	1.483	1.833	1.693	1.52	1.846	1.528	450
C	1.187	1.831	1.781	1.789	1.868	1.659	1.673	1.687	1.879	1.739	2.09	1.575	450
D	1.444	1.426	1.585	1.409	1.79	1.606	1.423	1.497	0.352	0.056	0.109	0.118	450
E	1.297	1.692	1.55	1.767	1.629	1.634	1.724	1.845	1.731	1.504	1.869	1.684	450
F	1.388	1.495	1.442	1.475	1.742	1.979	1.604	1.699	1.506	1.48	1.632	1.613	450
G	1.367	1.623	1.485	1.63	1.8	1.704	1.706	2.269	1.959	1.681	1.873	1.592	450
H	1.379	1.48	1.503	1.533	2.014	1.59	1.558	1.897	1.643	1.617	1.751	1.44	450

5号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.296	1.304	1.27	1.212	1.389	1.221	1.428	1.267	1.267	1.11	1.339	0.97	450
B	1.408	1.516	1.226	1.339	1.251	1.27	1.295	1.237	1.184	1.125	1.017	0.837	450
C	1.566	1.324	1.412	1.332	1.366	1.307	1.365	1.435	1.261	0.789	1.037	0.819	450
D	1.325	1.379	1.267	1.287	1.293	1.127	1.425	1.397	1.138	0.611	1.038	0.533	450
E	1.463	1.251	1.183	1.291	1.229	1.25	1.627	1.351	1.181	1.228	1.083	1.5	450
F	1.44	1.236	1.206	1.26	1.506	1.164	1.141	1.164	1.131	0.938	1.07	0.982	450
G	1.446	1.411	1.194	1.476	1.341	1.213	1.277	1.201	1.508	1.076	1.577	0.956	450
H	1.128	1.555	1.335	1.388	1.338	1.241	1.293	1.189	1.353	1.165	1.158	0.059	450

注：红色代表挑选的阳性细胞株

Comment: Red represent the positive cell line selected.

3.5 杂交瘤细胞的亚克隆

在显微镜下找到融合细胞，对其进行亚克隆并标记。杂交瘤细胞的亚克隆化对其生长极其不利，因此，分单克隆时需制备饲养层。为了保证结果的准确性，经过两次亚克隆后，又进行WB检测。将WB检测阳性孔传至24孔板，收集培养基，检测外源过表达pc5-flag-CT55。WB阳性结果出来后（图5），将杂交瘤细胞冻存。标记方法：若第一次挑选的孔是1C6，挑中了此株的F6孔，则第一次亚克隆的株数标为1C6F6；在此基础上，若挑选该株的G3孔，则第二次亚克隆的株数标为1C6F6G3。

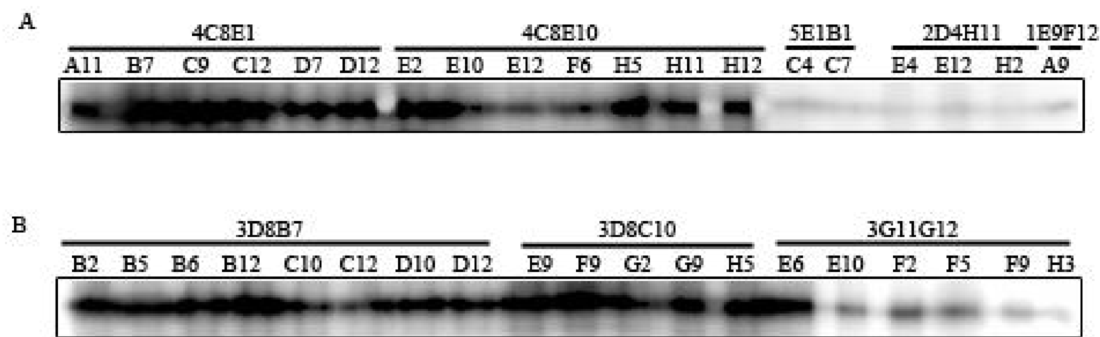


图 5 第二次亚克隆 WB 检测结果

Fig.5 WB detection result of the second subclone cell line.

图 A 和图 B 将外源过表达 CT55 基因的细胞裂解液作为检测蛋白，第二次亚克隆细胞株培养基上清作为检测抗体，然后进行 WB 实验。

Fig.A and Fig.B Exogenous overexpression CT55 gene cell lysate is used for a test protein, the second subclone cell culture supernatant is used for a test antibody, then conduct WB analysis.

3.6 腹腔注射杂交瘤、取腹水并检测

从第二次亚克隆 WB 结果中找到阳性杂交瘤细胞株，腹腔注射给小鼠。两周后取腹水（抗体浓度高，就不需要对腹水进行纯化），检测 CT55 蛋白外源表达的表达。在蛋白样品中，可能存在和 CT55 一样大小的蛋白分子或 WB 检测到的只是标签，所以通过 WB 来排除标签或者其他蛋白的影响（图 6）。在图 3-5 中，可以得到一个结论：在蛋白样量一定、标签抗体和腹水同样比例稀释的情况下，腹水显出 CT55 蛋白的强度更强。

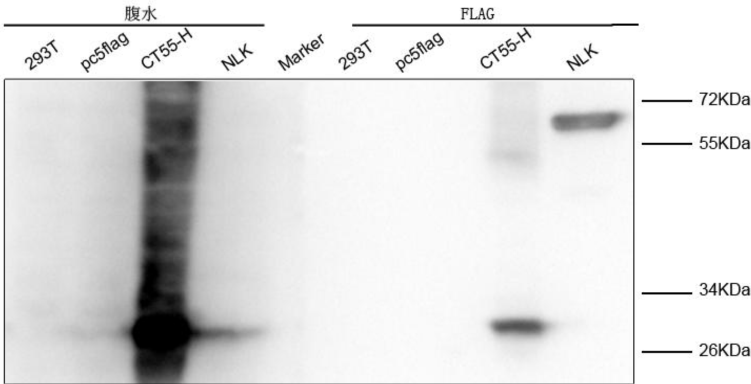


图 6 排除其他蛋白以及标签的影响

Fig.6 Exclude other protein influences.

3.7 P53 与 CT55 共定位

在 Luciferase 实验中发现：在 mRNA 水平上，CT55 可以激活 P53 的表达。为了进一步验证 CT55 与 P53 是否有相互作用，设计了免疫荧光实验。P53-HA 和 CT55-FLAG 共转 HCT116 细胞，并用单转的 CT55-FLAG 作对照。用鼠源的腹水和兔源的 HA 标签抗体作为 CT55 蛋白和 P53 蛋白的一抗，孵育荧光二抗，最后 DAPI 染核。用 LSCM 技术拍照（见图 7）。经过分析图片，发现在单独转染 CT55 蛋白时，此蛋白分布在细胞质中；与 P53 共转时，CT55 蛋白核质都有分布。从图中看出，这两种蛋白存在相互作用，作用部位在细胞核。两分子的相互作用机制还需要进一步的试验探究。

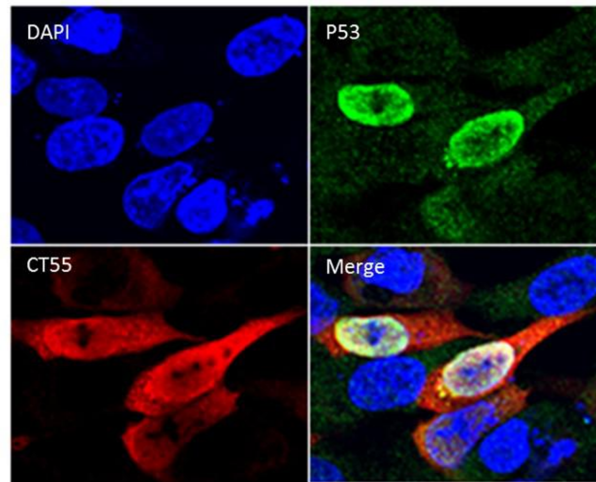


图 7 CT55 蛋白与 P53 蛋白的荧光共定位

Fig.7 Immunofluorescence localization of CT55 and p53.

4 实验分析

单克隆抗体具有特异性强、敏感度高的特点，所以本研究通过制备 CT55 蛋白的单克隆抗体，为准确而快速地检测该蛋白奠定一定的基础。

在利用纯化蛋白免疫小鼠的过程中，重组 CT55 蛋白在大肠杆菌中高水平表达并存在于上清中。本研究采用反复洗涤法来纯化蛋白，该方法简便、高效。细胞融合时，Sp2/0 细胞应呈现圆形并处于对数生长期。对免疫后的小鼠脾细胞与细胞株 Sp2/0[17]进行细胞融合后，用 ELISA 方法筛选出含有杂交瘤细胞的阳性孔。经 24 孔板培养后，再进行 WB 检测，检测为阳性的孔，有可能成功获得杂交瘤阳性细胞。但是由于刚开始经过融合后的二倍体细胞，其基因组不稳定及细胞适应性比较差，所以极易造成细胞死亡，分泌抗体的能力很大可能丢失，导致杂交瘤株的筛选失败。起初对杂交瘤细胞的培养应该选用与培养 sp2/0 及细胞融合时同种类型及相同浓度的血清，并在传代过程中逐渐降低血清的浓度，可以确保杂交瘤细胞的生长状态良好。免疫小鼠时，使用了 Quick Antibody 快速免疫佐剂，这种佐剂仍可刺激机体的免疫系统产生特异性抗体，效价可达上万以上，满足实验需求[18]。

本研究运用免疫荧光法鉴定了杂交瘤细胞株，排除了结果的假阳性，也弥补了单纯使用 ELISA 检测法筛选的不足。

参考文献

[1] Zendman, A.J., et al., *The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma.* Int J Cancer, 2002. **99**(3): p. 361-9.

[2] Bazhin, A.V., et al., *Expression of GAGE family proteins in malignant melanoma.* Cancer Lett, 2007. **251**(2): p. 258-67.

[3] Chomez, P., et al., *An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family.* Cancer Res, 2001. **61**(14): p. 5544-51.

[4] Dong, X.Y., et al., *BJ-HCC-20, a potential novel cancer-testis antigen.* Biochem Cell Biol, 2004. **82**(5): p. 577-82.

[5] Tomiyoshi, G., et al., *Novel BRCA2-interacting protein BJ-HCC-20A inhibits the induction of apoptosis in response to DNA damage.* Cancer Sci, 2008. **99**(4): p. 747-54.

[6] Matsushita, M., et al., *CXorf48 is a potential therapeutic target for achieving treatment-free remission in CML patients.* Blood Cancer J, 2017. **7**(9): p. e601.

[7] Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined*

specificity. 1975. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2453-5.
[8] Petersen, V.B., et al., *A human-mouse hybridoma which secretes monoclonal thyroglobulin autoantibody with properties similar to those of the donor patient's serum autoantibody.* Autoimmunity, 1989. **4**(1-2): p. 89-102.
[9] Dickman, S., *Antibodies stage a comeback in cancer treatment.* Science, 1998. **280**(5367): p. 1196-7.
[10] Presta, L.G., *Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function.* Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(5-6): p. 640-56.
[11] Qian, W., et al., *Development of new versions of anti-human CD34 monoclonal antibodies with potentially reduced immunogenicity.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **367**(2): p. 497-502.
[12] Schirrmann, T., et al., *Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy.* Molecules, 2011. **16**(1): p. 412-26.
[13] Lonberg, N., *Human monoclonal antibodies from transgenic mice.* Handb Exp Pharmacol, 2008(181): p. 69-97.
[14] 涂水平. 单克隆抗体治疗消化系肿瘤的现状及前景[J]. 国际消化病杂志, 1993(1):13-17.
The current situation and Prospect of monoclonal antibody therapy for digestive tract tumors [J].International Journal of Digestive Diseases, 1993 (1): 13-17.
[15] 周清华, 杨振华, 杨俊杰. 单克隆抗体在肺癌诊断治疗中的应用[J]. 华西医学, 1991(1):120-123.
Qinghua Zhou, Zhenhua Yang, Junjie Yang. Application of monoclonal antibody in the diagnosis and treatment of lung cancer [J].Western China Medicine, 1991 (1): 120-123.
[16] 赵慧娟, 臧学丽, 谢蕙明,等. 单克隆抗体的应用现状及前景[J]. 吉林农业, 2013(2):59-60.
Huijuan Zhao, Xueli Zhang, Huiming Xie, et al. [J].Jilin Agriculture, 2013 (2): 59-60.
[17] Edward AG.2014.Antibodies: A laboratory manual(2nd ed). NewYork: Cold Spring Harbor laboratory Press, 110 ~111.
[18] Evaluation of a water-soluble adjuvant for the development of monoclonal antibodies against small-molecule compounds[J].浙江大学学报（英文版）（B 辑：生物医学和生物技术）,2016,17(4):282-293.